

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Thèse Série Université - Paris 1944 - N° 90

Contribution à l'étude du dosage chimique et biologique de l'Histamine

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

Docteur en Pharmacie

présentée et soutenue le

PAR

Madeleine-Anne DURISCH

JURY { MM. REGNIER
VALETTE
PARIS

PARIS

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1944

FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Nom du Candidat : **DURISCH.**

Prenom : **Madeleine-Anne.**

Date de la soutenance :

Numéro d'ordre :

1

DURISCH (Madeleine-Anne). —
Contribution à l'étude du dosage
chimique et biologique de l'hista-
mine.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris,
1944, Série Univ. n° 90.

2

DURISCH (Madeleine-Anne). —
Contribution à l'étude du dosage
chimique et biologique de l'hista-
mine.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris,
1944, Série Univ. n° 90.

3

DURISCH (Madeleine-Anne). —
Contribution à l'étude du dosage
chimique et biologique de l'hista-
mine.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris,
1944, Série Univ. n° 90.

4

DURISCH (Madeleine-Anne). —
Contribution à l'étude du dosage
chimique et biologique de l'hista-
mine.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris,
1944, Série Univ. n° 90.

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Thèse Série Université - Paris 1944 - N° 90

**Contribution à l'étude
du dosage chimique et biologique
de l'Histamine**

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

Docteur en Pharmacie

présentée et soutenue le

PAR

Madeleine-Anne DURISCH

JURY { MM. REGNIER
VALETTE
PARIS

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1944



Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, *Doyen*, O. ✱, ☉ I.
SOMMELET, *Assesseur*, ✱, ☉ I.
H.-J. LIONNET, *Secrétaire*, ✱ I.

PROFESSEURS

MM. DAMIENS, O. ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
SOMMELET, ✱, ☉ I.	Chimie organique.
FABRE, ✱, ☉ I.	Toxicologie.
DELABY, ✱, ☉ I.	Pharmacie chimique.
PICON, ✱, ☉ I.	Physique.
MASCRE, ✱, ☉ I.	Histoire naturelle des Médicaments simples d'origine végétale.
BACH, ✱, ☉ I.	Botanique générale.
FLEURY, ☉ I.	Chimie biologique.
REGNIER, ☉ I.	Microbiologie.
JANOT, ☉ A.	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, ☉ I.	Chimie analytique.
VALETTE, ☉ A.	Zoologie appliquée.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✱, ☉ I. — GUERIN, O. ✱, ☉ I.

Professeur honoraires

MM. DELEPINE, O. ✱, ☉ I. et LEBEAU, O. ✱, ☉ I., Membres de l'Institut.
PERROT, C. ✱, ☉ I., COUTIERE, O. ✱, ☉ I., BOUGAULT, O. ✱, ☉ I.,
LUTZ, ✱, ☉ I., GORIS, O. ✱, ☉ I., HERISSEY, H. ✱, ☉ I. et
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. BEDEL, ☉, ☉ I.	Minéralogie, Législation et Déontologie pharmaceutiques.
N.	Hydrologie et Hygiène.
N.	Cryptogamie et technique microbologique. Pharmacodynamie.
N.	Histoire naturelle.
GUILLOT	Sciences physiques et chimiques.
PARIS	Sciences naturelles.
GAUTIER, ☉ A.	Sciences physiques et chimiques.
RAOUL	Sciences naturelles.
DAVID, ☉ I.	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, ☉ A.	Travaux pratiques de 1 ^{re} année. Chimie générale et pharmaceutique.
N.	Travaux pratiques de 2 ^e et 3 ^e années. Chimie analytique.
CRETE	Micrographie.
CORRIEZ, ☉ A.	Physique.
N.	Microbiologie.
COURTOIS	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ☉ A.

Bibliothécaire : M^{lle} LAVAUD, ☉ A.

A MON MAÎTRE VÉNÉRÉ

MONSIEUR LE PROFESSEUR MARC TIFFENEAU

Officier de la Légion d'Honneur
Professeur de Pharmacologie à la Faculté de Médecine
Membre de l'Académie de Médecine
Membre de l'Académie des Sciences

*En hommage respectueux et en signe
de profonde gratitude.*

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. REGNIER

Professeur de Microbiologie

*Vous avez bien voulu accepter de
présider cette thèse. Nous vous en
exprimons notre vive gratitude.*

AUX MEMBRES DE MON JURY

MONSIEUR LE PROFESSEUR VALETTE

Professeur de Zoologie appliquée

MONSIEUR PARIS

Maître de Conférence

*Veuillez trouver ici un témoignage de
reconnaissance pour l'enseignement que
j'ai reçu de vous.*

A MON MAÎTRE DE STAGE

MONSIEUR JULES TIFFENEAU

Docteur en Pharmacie

*En sincère remerciement pour l'aide
précieuse apportée à mes débuts.*

REMERCIEMENT FILIAL

A MON PERE ET A MA MERE

*Grâce à leur sollicitude quotidienne,
cette thèse a pu voir le jour.*

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	11
--------------------	----

PREMIERE PARTIE

<i>Dosage chimique de l'histamine</i>	15
I. Solutions aqueuses d'histamine pure	16
II. Solutions d'histamine dans les milieux biologiques	27

DEUXIEME PARTIE

<i>Titrage biologique de l'histamine</i>	33
I. Cœur isolé de grenouille	35
II. Estomac de grenouille	43
III. Intestin de cobaye	48
CONCLUSIONS	56
BIBLIOGRAPHIE	59

Contribution à l'étude du dosage chimique et biologique de l'Histamine

L'étude de l'histamine présente un intérêt considérable non seulement en thérapeutique où ses applications sont d'ailleurs assez limitées, mais surtout en physiopathologie où l'on tend de plus en plus à admettre son rôle dans la pathogénie de diverses maladies allergiques (asthme, migraine, urticaire) et surtout dans la production du choc anaphylactique dont la ressemblance avec le choc histaminique est des plus frappante.

Aussi le problème du dosage de l'histamine dans le sang et dans les tissus s'est-il posé depuis longtemps. Il a été résolu d'une manière très satisfaisante, malgré toutes les difficultés qu'il comporte et qui sont dues d'une part à l'exiguité des quantités d'histamine existant normalement dans l'organisme humain et animal, d'autre part à la présence d'autres substances susceptibles de gêner le dosage. Le problème est naturellement beaucoup plus simple lorsqu'il s'agit de doser l'histamine dans les préparations pharmaceutiques. Si l'on excepte en effet le cas des drogues dont le comportement est très complexe, comme c'est le cas pour l'ergot de seigle dans lequel le dosage de l'histamine présente les mêmes difficultés que celles rencontrées pour effectuer ce dosage dans les tissus, les préparations galéniques d'histamine sont généralement des solutions pures à des dilutions non excessives.

Quoi qu'il en soit de ces considérations, le dosage de l'histamine peut toujours en principe se ramener à deux cas, d'une part le cas des solutions ne renfer-

mant que de l'histamine seule (solutions pures) ou associée à un petit nombre de substances connues et facilement repérables, d'autre part le cas des solutions complexes dans lesquelles il convient, comme nous le verrons plus loin, d'extraire l'histamine et de préparer des solutions dont le titrage se ramène alors à celui des solutions pures. C'est à ce problème déjà résolu, mais dont il est toujours utile de contrôler ou d'améliorer les diverses techniques proposées que nous avons consacré le présent travail. Nous avons utilisé à cet effet les deux types de méthodes auxquelles ont eu recours les chercheurs : les unes chimiques, les autres biologiques.

Les méthodes chimiques consistent surtout en des réactions colorimétriques dans lesquelles, mettant à profit la présence dans l'histamine d'un groupe aminé, on opère une diazotation en présence d'une copule convenablement choisie de manière à réaliser une matière colorante diazoïque qu'on dose colorimétriquement. C'est donc une méthode qui n'est pas rigoureusement spécifique mais qui, correctement maniée et contrôlée, peut cependant donner de bons résultats.

Quant aux méthodes biologiques elles consistent à provoquer sur un organe isolé tel que le cœur, l'intestin ou l'utérus de divers animaux de laboratoire une réaction caractéristique de l'histamine, après avoir éliminé préalablement, lorsque cela s'impose, toute autre substance susceptible de produire la même réaction.

Ces deux types de méthodes étaient déjà bien connus quand nous avons entrepris nos recherches. Celles-ci ont donc eu simplement pour objet d'étudier systématiquement et dans tous leurs détails les tech-

niques jusque là adoptées, d'en contrôler ou d'en comparer la sensibilité.

Notre travail comprend essentiellement deux parties, l'une consacrée au dosage chimique de l'histamine, l'autre à son titrage biologique. Il a été entrepris dès 1939 dans le laboratoire du professeur TIFFENEAU, sous la direction de M. CAHEN qui nous en avait suggéré l'étude et qui, après avoir appris le maniement de chacune des techniques, nous en a montré les écueils. Lorsqu'il quitta le laboratoire en 1940, M. CAHEN continua pendant quelques mois, jusqu'à son départ pour l'Amérique, de nous guider patiemment et utilement ; nous lui adressons, de loin, nos très vifs remerciements.

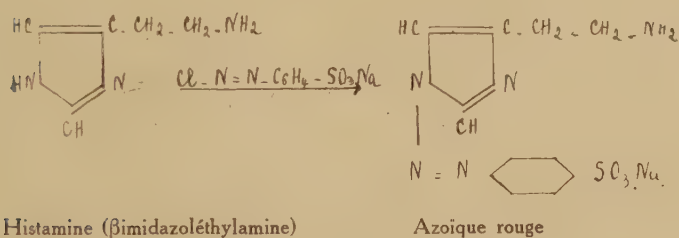
A partir de 1941 nous avons achevé ce travail avec l'aide et les conseils du docteur Robert TIFFENEAU, chef de travaux pratiques de pharmacologie et de Mlle M. BEAUVALLET, chef du laboratoire du professeur TIFFENEAU. Grâce à leur précieux concours nous avons pu achever ce travail et en entreprendre la rédaction. Nous leur exprimons à tous deux nos sentiments de très vive gratitude.

En présentant ce travail, nous tenons à témoigner à M. le professeur TIFFENEAU notre profonde reconnaissance non seulement pour le grand intérêt et la vive sollicitude qu'il nous a toujours portés, mais aussi pour les encouragements qu'il n'a cessé de nous prodiguer au cours de nos recherches. Nous n'oublierons pas non plus de le remercier très vivement de l'empressement avec lequel il a mis son laboratoire et sa bibliothèque à notre entière disposition.

PREMIÈRE PARTIE

DOSAGE CHIMIQUE DE L'HISTAMINE

Dans toutes les techniques proposées, le dosage chimique de l'histamine est basé sur une réaction de diazotation, dite réaction colorimétrique de Pauly. Cette réaction, qui consiste dans la copulation de l'histamine avec le chlorure de diazosulfanilate de sodium, donne lieu à la formation d'un azoïque rouge dont on mesure l'intensité au colorimètre :



Cette réaction ne peut être effectuée que sur des solutions d'histamine pure. Aussi peut-elle être appliquée directement au cas des préparations galéniques qui ne renferment que de l'histamine, rarement associée à d'autres substances, mais dont il convient, pour chaque cas, d'examiner dans quelle mesure les subs-

tances ainsi associées sont susceptibles de troubler la réaction.

Lorsqu'il s'agit de constituants de l'organisme humain ou animal (sérum, sérosités, tissus divers) il est nécessaire de procéder préalablement à l'extraction de l'histamine par des méthodes appropriées.

Nous avons examiné séparément ces deux cas. Nous exposerons tout d'abord le cas des solutions aqueuses d'histamine pure, puis celui des liquides ou tissus de l'organisme.

I. — SOLUTIONS AQUEUSES D'HISTAMINE PURE

Comme nous l'avons dit plus haut, toutes les méthodes de dosage chimique de l'histamine se ramènent à un dosage colorimétrique de la matière colorante rouge que forme l'histamine lorsqu'on effectue sa diazotation par l'acide sulfanilique et l'acide azoteux. Plusieurs techniques ont été proposées. Une des premières en date est due à P. THOMAS [22] (1920). Plus tard, des modifications plus ou moins importantes furent apportées soit par SCHWARZ et RIEGERT [20 et 21] en 1936, soit par MACIAG et SCHOENTHAL en 1938 [17]. Nous exposerons successivement ces trois méthodes et pour chacune d'elles nous discuterons les diverses particularités de la technique, notamment le choix de l'écran le plus convenable pour la lecture au colorimètre et le choix du liquide de comparaison ; enfin la détermination du temps optimum pour l'achèvement de la réaction de diazotation. Nous avons tenu également à examiner la stabilité des solutions d'histamine afin d'éviter toute erreur due à leur altération.

1° Méthode de THOMAS. [22]

On prépare une solution (a) contenant 1 gr. d'acide sulfanilique, 1 cc. d'acide chlorhydrique concentré et 20 cc. d'eau distillée, et une solution (b) renfermant 0 gr. 50 de nitrite de sodium dans 100 cc. d'eau. On prélève quelques cc. du soluté contenant l'histamine et on y ajoute 1 cc. de (a), 2 cc. de (b) et une solution de carbonate de sodium à 10 % en quantité suffisante pour alcaliniser le milieu au tournesol.

On complète à 10 cc. avec de l'eau distillée. On obtient alors une coloration rouge cerise qui atteint son maximum en un temps relativement court et dont on mesure l'intensité au colorimètre « Pulfrich ».

Etude de la méthode. — Pour faire le titrage de l'histamine, il est nécessaire d'établir préalablement une courbe indiquant l'intensité de la coloration exprimée en « unités Pulfrich ». A cet effet, nous avons préparé une gamme de solutions d'histamine avec chacune desquelles nous avons effectué la réaction colorée de Pauly. Ces solutions d'histamine sont placées l'une après l'autre dans l'un des godets du Pulfrich, tandis que dans l'autre godet on place une liqueur témoin (eau distillée ou autre). Le passage d'un faisceau lumineux au travers des deux godets ainsi remplis fait apercevoir sur l'écran du Pulfrich une zone droite et une gauche dont la teinte est dissemblable. Un dispositif de réglage permet de faire varier l'intensité du faisceau lumineux jusqu'à obtention de l'uniformité de teintes des deux zones de l'écran. A ce moment on lit le chiffre indiqué par l'échelle du Pulfrich, graduée en unités et en dixièmes d'unité de 1 à 100.

Pour chaque concentration d'histamine, nous avons fait une série de lectures et nous avons pris la moyenne des chiffres ainsi obtenus, de façon à diminuer le plus possible les erreurs dues au coefficient personnel de l'opérateur.

Dans toutes ces mesures, il est nécessaire de vérifier préalablement que l'uniformité de teinte des deux zones de l'écran correspond bien au zéro de l'échelle Pulfrich, les deux godets contenant de l'eau distillée.

En principe, les solutions d'histamine doivent se préparer au moment du besoin. On peut cependant les conserver quelques jours en les mettant à la glacière en présence de toluène. Même en prenant ces précautions, le titre baisse progressivement.

L'étude que nous avons faite de cette méthode a porté sur les différents points suivants déjà signalés plus haut, savoir : choix de l'écran, variation de la coloration en fonction du temps, enfin variation dans les lectures faites comparativement soit avec le réactif lui-même, soit avec l'eau distillée.

a) *Choix de l'écran.* — Il nous a d'abord fallu choisir l'écran coloré le plus sensible. En effet, pour chaque écran et pour des concentrations déterminées d'histamine, il existe une zone de grande sensibilité, au delà de laquelle toute lecture devient impossible. Nous avons essayé chaque écran coloré avec les mêmes solutions d'histamine. Finalement, sur les trois disques retenus, le 4 (vert), le 3 (bleu) ainsi que le 5 (jaune vert) et pour des valeurs d'histamine s'étalant de 6 γ à 50 γ , c'est le filtre 4 qui s'est montré le plus sensible et a donné l'échelle la plus étendue.

Filtres	Point de la courbe correspondant à 6 γ (moyennes)	Point de la courbe correspondant à 50 γ (moyennes)	Etendue de l'échelle
4	59	8	51
3	46	3	43
5	79	49	30

La zone colorimétrique la plus sensible pour l'écran 4 choisi, s'étend des points 6 γ à 40 γ . Au-dessous de 6 γ et au-dessus de 40 γ la lecture n'est plus sensible.

b) *Variations de la coloration en fonction du temps.*

— La coloration due à la diazotation est peu stable. Comme l'indiquent LOEPER, LESURE et THOMAS [15], elle passe par un maximum cinq minutes après l'addition du dernier réactif pour décroître ensuite progressivement jusqu'à disparition complète.

Filtre 4 6 γ à 4 h. 01 $\rightarrow$ 61,5 50 γ à 3 h. 44 $\rightarrow$ 3,8
 à 4 h. 06 $\rightarrow$ 62 à 3 h. 49 $\rightarrow$ 6,25
 à 4 h. 10 $\rightarrow$ 53 à 3 h. 52 $\rightarrow$ 4,75
 à 4 h. 30 $\rightarrow$ 34 à 3 h. 55 $\rightarrow$ 3,75
 à 4 h. 45 $\rightarrow$ 27

Des résultats analogues sont obtenus avec les filtres 3 et 5. Le temps optimum de lecture est donc bien de cinq minutes.

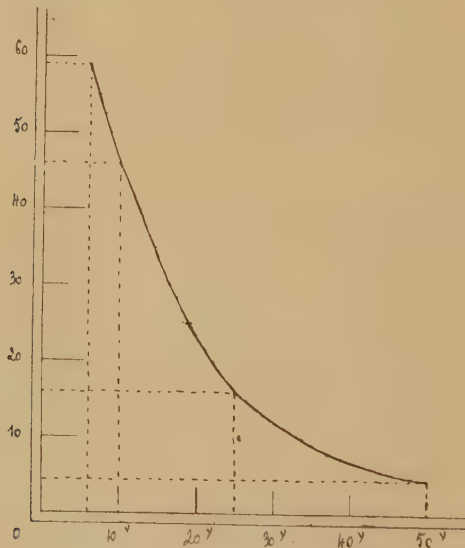
c) *Lectures faites comparativement soit avec le réactif lui-même soit avec l'eau distillée.* — Toute méthode de dosage recherche le maximum de sensibilité. Nous avons remarqué que, pour une même concentration d'histamine, la lecture à l'échelle Pulfrich donnait des résultats différents suivant que dans le second godet on avait placé de l'eau distillée ou le réactif lui-même sans histamine. L'ensemble des lectures faites comparativement avec de l'eau distillée pour des solutions renfermant 6 γ et 50 γ d'histamine

donnent une échelle moins étendue que celle obtenue avec le réactif comme élément de comparaison.

Filtre 4	Point moyen de la courbe correspondant à 6 γ		Point moyen de la courbe correspondant à 50 γ		de l'échelle Étendue	
	Eau	Réactif	Eau	Réactif	Eau	Réactif
	48	59	5	8	43	51

Tenant compte des différents points que nous avons étudiés : choix de l'écran (4), lecture de la réaction à son intensité maximum après cinq minutes de repos, lecture faite comparativement au réactif lui-même et utilisation de solutions fraîches d'histamine, nous avons établi une courbe. Nous avons porté en abscisses les γ d'histamine et en ordonnées les moyennes des chiffres correspondants à l'échelle du Pulfrich pour chaque concentration d'histamine.

Nous avons obtenu la courbe ci-dessous :



Courbe de la réaction de THOMAS

La valeur histaminique des points correspond à des γ de dichlorhydrate d'histamine (HOFFMAN-LAROCHE).

CONCLUSION

Cette méthode nous a donné de bons résultats, elle est sensible à un γ d'histamine ; sa manipulation est facile et rapide, une réaction de dosage d'histamine n'exigeant pas plus de six à sept minutes. Une condition indispensable pour que la méthode soit précise est de toujours évaluer la réaction colorée de diazotation cinq minutes exactement après sa formation afin d'atteindre son maximum d'intensité sans le dépasser car elle est relativement lente et fugace.

2° Méthode de SCHWARTZ et RIEGERT. [20 et 21]

Dans cette méthode on prépare extemporanément le réactif sulfanilique et on opère à la température de la glace fondante.

Cette méthode est inspirée de celle plus ancienne de HANKE M. et KÖESSLER K. [9]

On a recours à deux solutions : l'une (a) contenant 4 gr. 5 d'acide sulfanilique dans 5 cc. d'acide chlorhydrique à 37 % et eau distillée en quantité suffisante pour 500 cc. et l'autre (b) contenant 25 gr. de nitrite de sodium à 20 % dans de l'eau distillée en quantité suffisante pour 500 cc.

On mélange 1 cc. 5 de (a) et 1 cc. 5 de (b) et on maintient cinq minutes dans la glace. On ajoute 6 cc. de (b) puis, après cinq minutes de contact à la température

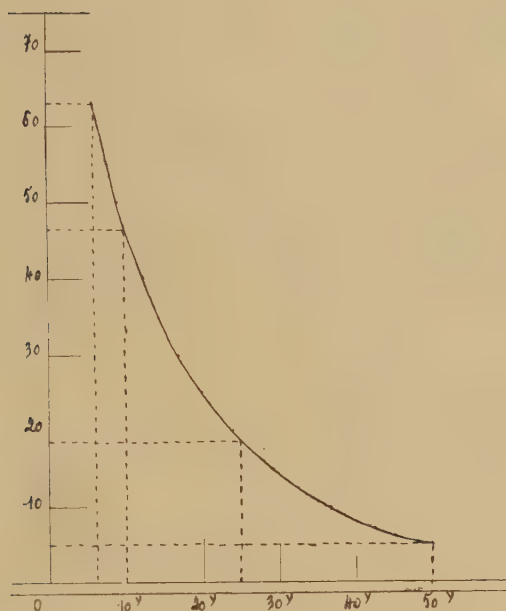
de la glace, on complète à 50 cc. avec de l'eau distillée. Le réactif ainsi préparé n'est employé qu'après un séjour de quinze minutes dans la glace.

La réaction qualitative s'obtient en ajoutant à 5 cc. de la solution de carbonate de sodium à 10 %, 2 cc. de réactif sulfanilique. On laisse en contact trente secondes au plus et on verse un cc. de la solution étalon d'histamine ou de celle à titrer, une minute après que le réactif a commencé à se mêler à la solution alcaline. La coloration rouge obtenue atteint son maximum après cinq minutes et on en mesure l'intensité au Pulfrich.

Etude de la méthode par l'examen et l'établissement de la courbe :

Comme étude de la méthode, nous nous sommes bornés à étudier les erreurs relatives qu'elle donne comparativement à la méthode de THOMAS. Nous avons adopté l'écran vert (1) dont l'emploi se justifiait d'après les expériences précédentes et le terme de cinq minutes comme temps optimum pour la lecture de la réaction de diazotation. Nous n'avons pas ici recherché si la lecture faite comparativement avec le réactif donnait des résultats différents de ceux obtenus avec de l'eau distillée.

Partant d'une solution mère de dichlorhydrate d'histamine à 10 %, nous avons fixé les points correspondants à 6 γ 10 γ 25 γ et 50 γ et nous avons obtenu la courbe suivante :



Courbe de la réaction de SCHWARTZ et RIEGERT

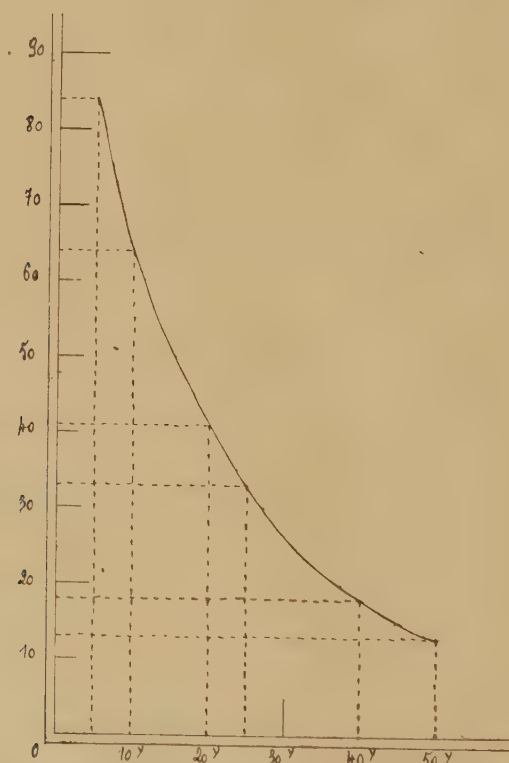
Cette courbe est sensiblement identique à celle obtenue suivant la méthode de THOMAS. Nous avons cependant remarqué que les points extrêmes, correspondant aux valeurs d'histamine de 6 γ — 10 γ — 25 γ — 50 γ déterminaient une erreur relative plus importante que dans la méthode de THOMAS.

CONCLUSION

Cette méthode donne des résultats qui sont très voisins de ceux de la méthode de THOMAS ; toutefois, cette dernière se montre supérieure non seulement par l'erreur relative qui y est moindre mais par sa technique qui y est plus simple.

3^e Méthode de MACIAG et SCHOENTAL. [17]

La réaction colorée obtenue par diazotation de l'histamine et de l'acide sulfanilique est assez fugace et passe, comme nous l'avons dit, par un maximum après cinq minutes. MACIAG et SCHOENTAL ont constaté que l'addition d'alcool éthylique rend beaucoup plus stable la coloration rouge obtenue par la réaction de PAULY.



Courbe de la réaction de MACIAG et SCHOENTAL

Ils mélangent 2 cc. de solution aqueuse de chlorhydrate d'histamine avec 1 cc. de solution concentrée de

carbonate de sodium, ils ajoutent 0 cc. 5 de réactif diazoïque préparé en mélangeant une partie d'une solution de 5 gr. d'acide sulfanilique dans 50 cc. d'acide chlorhydrique et 1.000 cc. d'eau, avec deux parties d'une solution de nitrite de sodium à 0,5 %. Immédiatement après, ils versent 1 cc. 5 d'alcool à 95°. La matière colorante formée se dissout aussitôt et l'appréciation de l'intensité est faite au Pulfrich par rapport à l'eau pure.

Etude de la méthode et établissement de la courbe :

Nous avons constaté que l'addition d'alcool proposée par MACIAG et SCHOENTAL rend la coloration due à la diazotation beaucoup moins fugace. La réaction colorée reste stationnaire pendant une moyenne de quinze à vingt minutes comme le montrent les essais suivants :

Réaction sans alcool :

25 γ	$\rightarrow$	après 2 minutes	13
	$\rightarrow$	3	18,25
	$\rightarrow$	5	22

Réaction avec 1 cc. 5 d'alcool :

25 γ	$\rightarrow$	après 3 minutes	32,5
	$\rightarrow$	15	32,5
	$\rightarrow$	30	32,5

Appliquant les différents points étudiés dans la méthode de THOMAS, nous avons ici encore adopté l'écran 4 du Pulfrich et fait la lecture comparative au réactif lui-même.

Utilisant la modification proposée par MACIAG et SCHOENTAL, nous avons dans nos dosages d'histamine

opéré de la façon suivante : à la solution d'histamine à titrer nous avons ajouté successivement 1 cc. du réactif sulfanilique (formule de THOMAS), 2 cc. du réactif au nitrite de sodium à 0 g. 5 %, 1 cc. 8 de la solution de carbonate de sodium à 15 % et 1 cc. 5 d'alcool à 95° ; on complète à 10 cc. avec de l'eau distillée et on fait la lecture à l'écran 4 du Pulfrich comparativement au réactif seul sans histamine.

Après avoir fait une série de lectures pour les points 6 γ — 10 γ — 25 γ — 50 γ nous avons obtenu la courbe suivante qui nous a servi pour le dosage de l'histamine dans les milieux biologiques, étudié page 24.

CONCLUSIONS

Cette méthode présente la même sensibilité que les précédentes ; de plus, par suite de l'addition d'alcool, la lecture de la réaction peut se faire plus rapidement aussitôt cette dernière terminée, elle peut encore se faire après plusieurs minutes sans qu'il y ait de changement dans la lecture. Elle présente donc sur les méthodes précédentes un avantage de temps et de manipulation.

En définitive, les trois méthodes étudiées par nous de THOMAS, SCHWARTZ et RIEGERT, MACIAG et SCHÖENTAL, nous ont toutes donné satisfaction. Les résultats obtenus sont, en effet, très voisins, mais nous avons finalement adopté la méthode de MACIAG, car elle nous a paru donner d'une manière constante les meilleurs résultats.

II. — SOLUTIONS D'HISTAMINE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

Lorsqu'il s'agit d'histamine contenue dans le sérum ou dans les tissus, son extraction est nécessaire. Diverses méthodes d'isolement ont été utilisées suivant les auteurs : électrodialyse (MAC GREGOR et THORPE) [16] 1933 ; adsorption puis élution (SCHWARTZ et RIEGERT) [20 et 21] 1936 ; défécation du milieu histaminique à l'acide phosphotungstique et centrifugation ou filtration (LÉPER-LESURE et THOMAS) [15] ; défécation à l'acide trichloroacétique des mêmes auteurs [12 et 13], de CODE [3 et 4], d'UNGAR, PARROT et POCCOULÉ [24].

Nous avons étudié la méthode d'adsorption de SCHWARTZ et RIEGERT. Son principe consiste à fixer l'histamine sur de la permutite (silicate d'alumine) et ensuite à la déplacer par élution, c'est-à-dire en faisant passer sur la permutite ainsi chargée d'histamine soit des solutions alcalines, soit des solutions salines concentrées qui enlèvent l'histamine fixée. On termine alors par un dosage colorimétrique par la réaction de PAULY. L'étude de cette méthode comporte donc, pour un même adsorbant (la permutite), la comparaison des résultats que l'on obtient en modifiant soit l'agent d'élution, soit les conditions dans lesquelles l'élution est réalisée.

Descriptions de la technique.

A) *Adsorption*. — Par suite de la richesse du sérum en sels minéraux, le pouvoir adsorbant de la permutite (zéolithe) vis-à-vis de l'histamine est faible ; on

obvie à cet inconvénient en diluant fortement la liqueur dans la proportion de 1/50. La liqueur convenablement diluée est agitée un temps déterminé, une heure ou plus, avec la permutite (1 gr. pour 10 cc. de sérum) finement pulvérisée et est séparée de cette dernière par filtration sur colonne.

B) *Elution.* — Pour la défixation, nous avons essayé soit une solution saturée de chlorure de sodium, soit une solution ammoniacale N/10 : ces agents d'élution sont employés soit par passage de la solution saline ou ammoniacale contenant la permutite sur colonne, soit par agitation de celle-ci pendant une heure ou plus avec la permutite.

C) *Réaction colorée.* — S'il a été fait usage d'une solution de Cl Na dans l'élution, cette liqueur filtrée sert directement dans la réaction de PAULY. L'ammoniaque, au contraire, faussant la réaction colorée, doit être éliminée. Pour cela, on décompose avec certaines précautions les sels ammoniacaux formés par de la soude et on chasse l'ammoniaque par distillation dans le vide (vérification au réactif de NESSLER). La réaction colorée est faite ensuite sur le résidu de la distillation préalablement déféqué à l'acide trichloroacétique : en effet, l'ammoniaque, en plus de l'histamine, déplace d'autres protéines du sérum qui sont adsorbées par la permutite et qui donnent la réaction de PAULY. Ces protéines passent dans le précipité de la défécation.

Résultats obtenus. — Nous avons d'abord fait des essais en extrayant l'histamine d'une solution aqueuse

en suivant la technique adsorption-élution-réaction colorée.

Sur 42 essais ::

16 nous ont donné un résultat inférieur à 50 %

26 » » » supérieur à 50 %

Il est à remarquer que les essais dans lesquels on a employé le chlorure de sodium comme agent d'élution donnent des moyennes inférieures à celles obtenues par la solution ammoniacale N/10.

Ainsi le pourcentage s'établit comme suit :

Pour le Cl Na, 5 % des résultats sont supérieurs à 50 % ; 19 % des résultats sont inférieurs à 50 %.

Pour NH_4OH N/10, 19 % des résultats sont inférieurs à 50 % ; 57 % des résultats sont supérieurs à 50 %.

Le mode d'élution, filtration lente sur colonne ou agitation une à deux heures, nous a conduits à des résultats identiques. Nos expériences se résument ainsi : 12 % des expériences :

« filtration » → résultat inférieur à 50 %
30 % des expériences :

« filtration » → résultat supérieur à 50 %
15 % des expériences :

« agitation » → résultat inférieur à 50 %
30 % des expériences :

« agitation » → résultat supérieur à 50 %

En ce qui concerne l'élimination des traces d'ammoniaque, différentes précautions sont nécessaires pour

éviter la destruction même partielle de l'histamine : la lessive de soude doit être ajoutée en quantité juste suffisante pour chasser l'ammoniaque ; la température du bain doit être aussi basse que possible. Nous avons opéré au B. M. au voisinage de 40° en nous aidant du vide obtenu par une trompe à eau.

CONCLUSION

Nos essais d'extraction de l'histamine en solution aqueuse nous ont conduits à adopter la technique suivante : adsorption de l'histamine par agitation pendant une à trois heures avec 1 gr. de permutite finement pluvérisée, puis filtration ; élution de la permutite restée dans le filtre par une solution ammoniacale N/10 en opérant soit par agitation de celle-ci avec la permutite, soit par passage de la même solution sur colonne ; élimination de l'ammoniaque et concentration de la liqueur par distillation dans le vide en présence de la quantité exactement calculée de soude ; réaction colorée effectuée d'après MACIAC et SCHËNTAL sur le distillat neutralisé par de l'acide chlorhydrique dilué.

Nous avons appliqué cette méthode à l'extraction de l'histamine du sérum. Nous avons employé dans nos essais du sérum de cheval (Hémostyl) auquel nous ajoutons une quantité déterminée de chlorhydrate d'histamine (25 γ à 1.000 γ). Comme nous l'avons dit, il est nécessaire de déféquer le sérum à l'acide trichloroacétique pour éliminer les protéines adsorbées par la permutite. Cette opération se fait après avoir chassé l'ammoniaque.

Comparativement à chaque essai, nous avons fait un essai témoin sur du sérum Hémostyl non additionné d'histamine. Nous avons comparé les deux résultats : le taux d'histamine du sérum additionné d'histamine au taux d'histamine du sérum Hémostyl seul.

En moyenne, nous avons retrouvé 60 à 70 % de l'histamine ajoutée.

DEUXIÈME PARTIE

TITRAGE BIOLOGIQUE DE L'HISTAMINE

Le titrage biologique a fait l'objet de très nombreux travaux et les méthodes les plus diverses ont été décrites dans lesquelles les auteurs se sont proposés, suivant les problèmes qu'ils avaient à résoudre, non seulement de contrôler l'exactitude et la fidélité de ce titrage, mais aussi de s'assurer de sa spécificité.

Dans le cas le plus simple, celui du contrôle des préparations pharmaceutiques d'histamine, il s'agit de solutions pures d'histamine et l'on n'a, en principe, à se préoccuper que de l'exactitude du titrage sans même exiger une grande sensibilité. Dans le cas le plus compliqué et aussi le plus difficile, celui qui concerne le dosage de l'histamine dans le sang et dans les tissus, il y a lieu non seulement d'exiger que la méthode soit très sensible puisque les quantités sont très petites, mais surtout de supprimer toutes les causes d'erreur résultant de la présence d'autres substances capables d'exercer des effets analogues, soit en détruisant ces substances par des réactifs chimiques appropriés ne touchant pas à l'histamine, soit en recherchant les tests présentant le maximum de sensibilité pour l'histamine et le minimum pour les autres substances à action analogue.

Le but que nous nous sommes proposés concerne surtout le cas le plus simple, celui du contrôle des préparations pharmaceutiques, en recourant à un test qu'on puisse se procurer facilement et ne nécessitant ni un appareillage compliqué, ni de trop grosses dépenses d'animaux. Désirant éviter l'emploi du thermostat, inévitable avec les muscles lisses des mammifères, nous avons d'abord eu recours aux organes de grenouille. Dans nos essais, nous avons utilisé comme test le cœur et l'estomac isolés. Les résultats obtenus s'étant montrés assez décevants, nous nous sommes trouvés dans l'obligation de recourir aux organes des mammifères et nous avons alors mis au point une méthode dérivant de celle de BARSOUM et GADDUM [1], mais utilisant des fragments de rectum au lieu d'intestin grêle de cobaye. Nous décrirons successivement nos méthodes personnelles sur le cœur et l'estomac de la grenouille, puis sur le rectum de cobaye et nous en comparerons les résultats avec ceux de la méthode classique de BARSOUM et GADDUM, la plus usuellement employée à l'heure actuelle.

§ 1. — Cœur isolé de grenouille

L'étude des effets de l'histamine sur le cœur isolé de la grenouille a conduit jusqu'à présent à des résultats assez contradictoires. Certains auteurs parmi lesquels BERESIN [2], signalent une augmentation de l'amplitude des systoles et un accroissement de la fréquence pour des concentrations supérieures à 10^{-7} . EINIS [5] observe bien un faible renforcement des contractions, mais en même temps une diminution de la fréquence. Inversement LIO [14] constate que les solutions d'histamine à 10^{-5} augmentent la fréquence, cependant que l'amplitude diminue au bout de quelques minutes. KRULL [11] ne peut mettre en évidence l'augmentation de la fréquence que sur le cœur de *Rana temporaris*; sur tous les autres cœurs il obtient un ralentissement. Enfin MARTIN [18] observe une action inotrope positive sur la grenouille de printemps et une action inhibitrice sur la grenouille d'hiver.

Il semble bien que ces résultats contradictoires soient dus aux trop faibles doses (variant de 10^{-7} à 10^{-6}) employées par tous les auteurs précédemment cités. En effet GUGGENHEIM [7], puis R. TIFFENEAU [23], qui expérimentent avec des concentrations d'histamine plus fortes, variant de 1/1000 à 1/100 ne constatent exclusivement que des actions inhibitrices : diminution de l'amplitude et ralentissement de la fréquence; ces auteurs observent d'ailleurs que l'effet inotrope négatif ne se maintient que pendant quelques minutes : il est suivi d'un effet inotrope positif, malgré la présence constante du poison au niveau de l'organe (R. TIFFENEAU [23]). Les expériences que nous allons relater ici nous amènent aux mêmes conclusions

que ces derniers auteurs. A dose convenable, l'histamine provoque sur le cœur de grenouille une diminution d'amplitude des systoles qui, pour des concentrations plus fortes, est suivie d'un ralentissement du rythme, pouvant aboutir à l'arrêt complet des pulsations; cet effet inhibiteur est suivi après quelques minutes, d'un retour vers l'état antérieur. Voici la technique que nous avons utilisée dans nos expériences.

Technique. — La grenouille décapitée est étendue sur une planchette de liège. On sectionne les clavicules et on découvre le cœur en rejetant de côté le sternum. Après avoir introduit une canule effilée par la crosse aortique gauche jusqu'au ventricule, on ligature les vaisseaux et on isole le cœur (méthode de Straub). La pointe du cœur est reliée par un fil à un stylet inscripteur qui enregistre les contractions sur un papier noirci au noir de fumée. La cavité cardiaque est alors remplie d'une solution de Ringer après avoir été débarrassée avec soin de toutes traces de sang. La solution de Ringer que nous avons utilisée est obtenue en mélangeant extemporanément 90 cc. d'eau distillée avec 9 cc. 5 de la solution 1 et 0 cc. 5 de la solution 2.

SOLUTION 1

ClNa	65 g.
ClK	1 g. 4
Cl ² Ca	1 g. 2
PO ⁴ HNa ²	0 g. 2
OH ²	950 cm ³

SOLUTION 2

CO^3HNa	30
OH^2	500 cm^3

Le cœur présente alors une activité automatique régulière qui généralement persiste inchangée pendant plusieurs heures. Pour maintenir constante cette activité automatique, il faut veiller à ce que le volume de Ringer contenu dans la cavité cardiaque et la canule reste toujours identique, de façon à ce que la pression exercée sur le cœur soit invariable. Après avoir attendu un temps suffisant pour que l'amplitude et le rythme des systoles cardiaques se soient régularisés, on remplace la solution de Ringer pure par la même solution contenant des proportions variables d'histamine et préparée au moment de l'essai par addition d'une petite quantité d'une solution mère de 1 % de dichlorhydrate d'histamine.

Sensibilité. — Les concentrations d'histamine voisines de 1p 100.000 ou 1p 10.000 ne provoquent, en général, sur le cœur de grenouille aucune diminution d'amplitude des systoles. Avec des concentrations variant de 1p 2.000 à 1p 800, on enregistre une diminution immédiate de l'amplitude, celle-ci pouvant atteindre la moitié de la valeur initiale. Le cœur réagit encore aux doses de 1p 500 à 1p 250; mais on observe alors, en plus de la baisse de l'amplitude, une diminution de fréquence et souvent l'apparition d'arythmie. Enfin aux concentrations plus fortes il se produit en général un arrêt des battements.

Pour comparer entre eux les différents effets de l'histamine sur le cœur de grenouille, on peut prendre

comme test, soit le temps nécessaire pour provoquer une baisse d'amplitude déterminée, par exemple le tiers ou la moitié de l'amplitude initiale; soit la diminution maximum d'amplitude observée; soit enfin, l'effet liminaire de diminution d'amplitude constaté après une ou deux minutes. Nous avons adopté ce dernier test comme étant le plus rapide et donnant les résultats les plus constants. En effet, sous l'action prolongée de l'histamine il peut, dans certains cas, se produire des variations de l'amplitude des systoles qui sur le graphique s'enregistrent en dos d'âne et qui rendent impossible la constatation d'un phénomène suffisamment constant pour être utilisé comme test.

Comme tous les dosages biologiques cette méthode comporte des causes d'erreur dues aux variations individuelles de sensibilité du matériel vivant. Pour que le dosage biologique ait une certaine valeur, il faut naturellement que l'étalon et la substance à examiner soient expérimentés sur le même cœur. De plus, pour que le cœur de grenouille puisse être utilisé pour la recherche de l'histamine, il faut ::

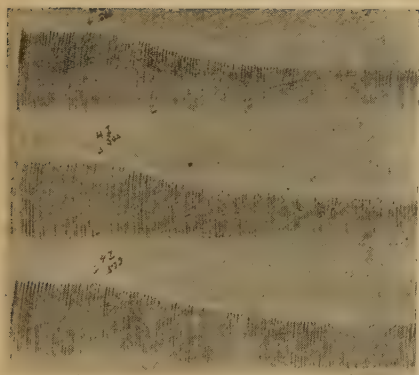
1° que les effets provoqués par la même dose de ce produit soient constants,

2° que les effets produits par deux doses voisines soient différents.

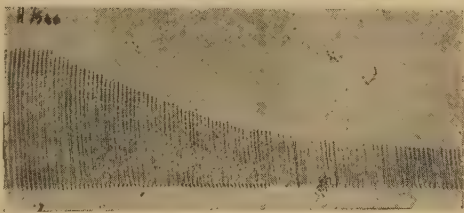
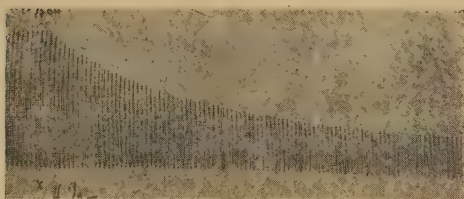
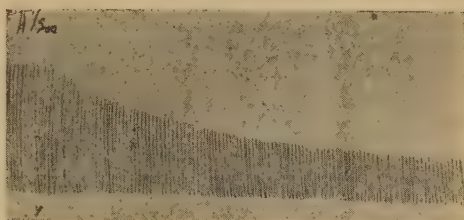
1° *Vérification de la constance des effets produits par la même concentration.* — Nous avons vérifié la constance de l'effet d'une même dose en faisant agir celle-ci plusieurs fois de suite sur un cœur ayant repris entre chaque essai son amplitude normale après lavage au Ringer. Nous avons fait nos essais en laissant l'histamine en contact soit une à deux minutes, soit

cinq à dix minutes et nous avons abouti aux conclusions suivantes :

a) Si l'on fait agir des solutions d'histamine de même titre pendant une à deux minutes, on constate des réponses identiques du cœur s'exprimant par des graphiques d'enregistrement superposables. (Exp. du 25/4/41). Ces réponses peuvent se reproduire identiquement cinq ou six fois de suite à condition que le cœur reprenne chaque fois son amplitude initiale par lavage au Ringer. Les essais exécutés avec des solu-



Effets identiques produits par une même dose d'histamine sur le cœur de grenouille.



Constance des effets produits par une solution d'histamine à la concentration de 1 p. 500 sur le cœur de grenouille. (Expérience du 25/4/41, essais 1, 3 et 4).

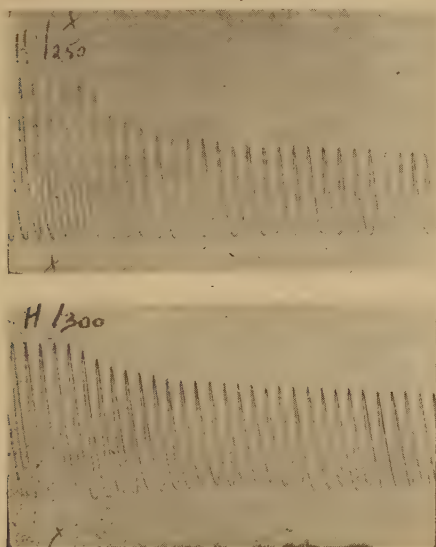
tions d'histamine à 1p 1.000 à 1p 500 et à 1p 400, ont donné des résultats satisfaisants. Mais après le cinquième ou sixième essai, on constate souvent que le cœur devient sensibilisé à l'action de l'histamine et répond par une diminution d'amplitude des systoles légèrement plus marquée.

b) Si on laisse l'histamine cinq ou dix minutes en contact avec le cœur, on obtient une réaction identique de l'organe pour les deux ou trois premiers essais; le cœur reprend alors facilement son amplitude et sa fréquence initiale après lavage au Ringer. Mais pour les essais ultérieurs l'effet est variable; parfois bien que très rarement, la constance de l'effet se maintient jusqu'au cinquième ou sixième essai; parfois encore le cœur ne réagit presque plus dès le cinquième et le sixième essai; mais le plus souvent, la répétition de l'action histaminique entraîne une augmentation d'effet par rapport aux premiers essais, avec une baisse d'amplitude plus marquée et apparition d'arythmie. Sur un total de 18 expériences (animaux différents), dans lesquelles l'histamine est restée en contact avec le cœur un temps supérieur à 5 minutes, nous n'avons observé que quatre fois un effet histaminique restant identique à lui-même jusqu'au 6^e, 7^e et 8^e essais; il y a eu deux fois accoutumance du cœur et dans les douze autres cas, la sensibilité du cœur s'est accrue. Nous n'avons pas cherché à expliquer la cause de ces variations.

Ainsi, pour que la méthode de dosage biologique de l'histamine sur le cœur de grenouille reste constante pendant plusieurs essais consécutifs, il ne faut pas maintenir l'histamine plus de deux ou trois minutes au contact de l'organe.

2° Vérification des différences d'effets produites par des concentrations différentes quoique voisines. —

Enfin, nous avons vérifié que deux doses voisines d'histamine produisent des effets différents. C'est ainsi que si l'on fait agir l'histamine à des concentrations de 1p 300 et 1p 250, on constate sur le tracé une différence sensible. A la solution la moins concentrée correspond une diminution d'amplitude moins forte, nette surtout si l'on considère l'effet immédiat produit. Des remarques analogues peuvent être faites pour des solutions d'histamine aux concentrations de 1p 300 et de 1p 350 (Exp. du 16/12/40.)



Effets différents produits par deux doses voisines d'histamine sur le cœur de grenouille.
(Expérience du 16/12/40)

CONCLUSIONS. — En résumé les effets de l'histamine sur le cœur de grenouille apparaissant à peu près constants tout au moins dans les cas où la durée d'action du produit reste courte, et ils permettent de différencier deux doses assez voisines. Le cœur isolé de grenouille ne permet cependant de caractériser que des doses relativement considérables de produits, doses supérieures à celles employées dans les préparations pharmaceutiques.

§ II. — Estomac de grenouille

Les travaux concernant l'action de l'histamine sur le tractus digestif de la grenouille sont très peu nombreux. En 1928, LIO [14] constate une diminution de tonus, tant de l'intestin grêle que du gros intestin : WATANABE [26], dans des expériences non publiées, rapportées par FELDBERG *et* SCHILF, observe un phénomène analogue sur l'intestin grêle, pour des concentrations d'histamine atteignant 1p 20.000. On pouvait s'attendre à ce que l'estomac réagisse également à cette substance par un relâchement; or, c'est le contraire qui se produit. Lorsque la concentration d'histamine est supérieure à 1/10.000 on observe en effet une contracture immédiate bientôt suivie d'un retour au tonus initial; en général, d'ailleurs, comme nous le verrons plus loin, le retour à la normale ne se fait pas graduellement, mais seulement après plusieurs contractures successives suivies de relâchement. Nous avons utilisé la technique suivante :

Technique. — L'appareil employé dans cette méthode se compose d'une éprouvette de 10 cm³ remplie de Tyrode et destinée à recevoir l'estomac isolé. L'éprouvette peut se vider par une ouverture placée à la partie inférieure. Un tube de verre creux, effilé et recourbé en crochet pénètre dans l'éprouvette et laisse passer bulle à bulle un courant d'air qui oxygène le liquide. L'estomac est fixé par son extrémité inférieure à ce tube et la résultante de ses mouvements est transmise par un fil de soie à un levier que l'on équilibre au moyen d'un poids. Le Tyrode servant aux expériences répond à la formule suivante :

ClNa	7 g.
ClK	0 g. 20
Cl ² Ca	0 g. 20
CO ³ Hna	1 g.
Cl ² Mg	0 g. 10
PO ⁴ H ² Na	0 g. 05
OH ²	1.000 cm ³

L'animal est sacrifié par section de la tête. On étend la grenouille sur une planchette de liège et on incise la peau et la paroi abdominale sur la ligne médiane. On découvre alors l'estomac, on noue un fil à sa partie terminale et au moyen d'un second nœud destiné à éviter le contact de l'organe avec le support on fixe cette extrémité au tube de verre creux. Une seconde ligature est faite à la partie supérieure du muscle à l'aide d'un fil que l'on relie au levier chargé de transmettre les mouvements. Dans ces conditions le tonus de l'estomac se stabilise après dix minutes à un quart d'heure environ.

Pour comparer les différents effets produits par l'histamine nous avons simplement mesuré sur les tracés l'amplitude des contractures obtenues, les doses d'histamine devant être suffisantes pour provoquer des élévations de tonus immédiates mais non trop fortes, ce qui provoquerait une fatigue du muscle et empêcherait celui-ci de reprendre après lavage au Tyrode son tonus initial.

Sensibilité. — Nous avons d'abord essayé des doses faibles d'histamine. Pour la solution au 10^{-6} , nous obtenons une contracture peu importante du muscle suivie d'un retour à la normale. Les solutions d'histamine de titre variant entre 10^{-5} et 10^{-4} ne donnent pas

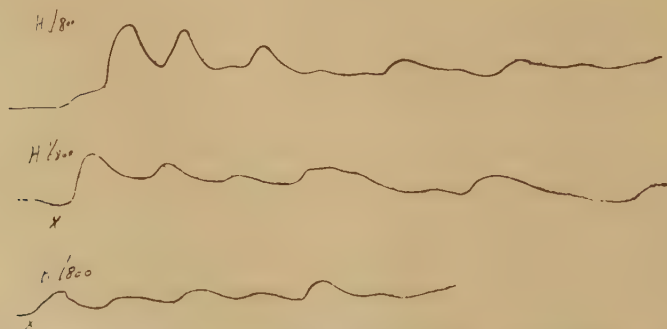
des effets plus nets. Avec une solution à 1p 2.000 nous obtenons une courbe typique : première contracture immédiate suivie d'une légère baisse du tonus, puis nouvelle contracture moindre que la précédente, suivie d'une baisse de tonus plus importante; trois ou quatre contractures et relâchements successifs se répètent avant le retour complet à la normale qui ne se produit qu'après sept ou dix minutes. Avec des solutions plus concentrées 1p 1.500, 1p 1.250, 1p 1.000, 1p 800, l'estomac répond de façon analogue par une montée de tonus immédiate, atteignant 2 à 2 cm. 5 de hauteur. Des doses plus fortes 1p 500, 1p 200, semblent provoquer une paralysie du muscle qui ne se contracte que légèrement ou reste insensible. Il résulte de ceci que l'estomac de grenouille ne réagit nettement à l'histamin que pour des concentrations variant entre 1p 2.000 et 1p 200.

Comme dans le cas du cœur, nous avons cherché d'une part, la constance de l'effet produit par une même dose quand on fait agir celle-ci plusieurs fois de suite, d'autre part la différence des effets produits par des doses voisines.

1° *Constance des effets produits par une même dose.*
— Nous avons fait agir plusieurs fois de suite sur un même estomac de grenouille une solution d'histamine de même concentration, en ayant soin de laver au Tyrode après chaque essai. La première action de l'histamine s'inscrit graphiquement par une élévation de tonus d'une certaine amplitude. Par lavage au Tyrode l'estomac se relâche complètement et après cinq minutes de repos on fait agir une solution d'histamine de concentration identique à la première. Ce second effet histaminique est en général sensiblement le

même que le premier, tant en ce qui concerne la montée du tonus que la durée d'action, mais si nous faisons agir une troisième fois la même solution d'histamine nous constatons alors une réponse moindre de l'organe se traduisant par une contracture moins forte, une ascension moins verticale et un retour à la normale plus rapide. L'effet devient d'autant moins marqué qu'on fait agir l'histamine un plus grand nombre de fois. L'estomac réagit donc différemment à des doses identiques d'histamine; il semble à la longue devenir moins sensible au poison (phénomène d'accoutumance).

Nous avons fait des essais en faisant agir plusieurs fois de suite des solutions d'histamine à 1p 2.000, 1p 1.250, 1p 1.000, 1p 800. Avec toutes ces concentrations nous obtenons de mêmes résultats; l'effet diminue quand on répète la dose. Ainsi, sur 12 expériences, faites sur des organes différents, 3 seulement montrent une sensibilité à peu près constante de l'organe utilisé. Dans les 9 autres cas, l'estomac donne des réponses de moins en moins fortes aux actions successives de l'histamine en solutions de titre constant (Exp. du 11 novembre 40).



Effets différents produits sur l'estomac de grenouille par l'action répétée d'une solution d'histamine à la concentration de 1 p. 800 (Expérience du 11/11/40).

Dans une autre série d'expériences nous avons fait agir des solutions d'histamine de même concentration, sans lavage au Tyrode entre les essais. Au moment où l'estomac est revenu à son tonus initial après avoir subi l'action d'une première solution d'histamine, nous remplaçons sans lavage la première solution d'histamine par une seconde de même titre; nous constatons alors que l'organe est insensible à ce changement de solution; cette insensibilité est d'ailleurs passagère, car après un lavage au Tyrode l'estomac est de nouveau capable de répondre par une contracture à la même solution.

Ainsi de l'ensemble de ces faits, il résulte qu'on ne peut faire avec un même estomac plus de 2 ou 3 essais successifs car sa sensibilité décroît assez rapidement. De plus, chaque dosage doit être suivi d'un lavage au Tyrode.

2° Effets différents produits par deux doses voisines d'histamine. — Si maintenant nous faisons agir des solutions d'histamine de concentration voisines, par exemple 1p 1.000 et 1p 800, en lavant la préparation entre les essais, nous ne constatons pas, comme dans le cas du cœur, de différences appréciables dans les tracés. Il faut que les doses soient assez éloignées les unes des autres pour que ces différences apparaissent.

CONCLUSIONS. — En résumé, les effets de l'histamine sur l'estomac de grenouille se montrent d'une part assez inconstants et d'autre part, ils ne permettent pas de différencier des doses voisines. Ainsi l'estomac de grenouille ne nous semble pas pouvoir être utilisé, plus que le cœur, dans les dosages biologiques de l'histamine.

§ III. — Intestin de cobaye

Nous venons de voir que les différents muscles lisses de la grenouille ne présentent vis-à-vis de l'histamine qu'une sensibilité à la fois trop faible et trop inconstante. Il semble bien que rien ne puisse remplacer les muscles lisses des mammifères, même dans le cas le plus simple où nous nous sommes placés ici, celui du titrage de l'histamine dans les préparations pharmaceutiques. Il nous a fallu abandonner l'idée que nous avions eue initialement de proposer une méthode simple réalisable sans thermostat. Nous avons dû, en conséquence, revenir à l'emploi des muscles lisses de mammifères qu'on sait être très sensibles, mais dont le fonctionnement exige un thermostat. Parmi ces muscles, le plus utilisé actuellement, depuis les travaux de BARSOUM et GADDUM [1], est l'intestin grêle de cobaye. La plupart des auteurs, à la suite de ces derniers, préfèrent expérimenter sur des fragments d'iléon, qu'ils jugent plus sensible; d'autres utilisent indifféremment des fragments de jejunum ou d'iléon. Tous s'accordent pour reconnaître, comme nous l'avons constaté nous-mêmes, qu'il existe de grandes différences individuelles et qu'il faut par conséquent recourir à plusieurs animaux qu'on est ainsi amené à sacrifier inutilement. Le titrage de l'histamine au moyen de l'intestin grêle de cobaye peut donc nécessiter une assez grande dépense d'animaux et entraîner en outre une notable perte de temps. Pour éviter ces inconvénients, nous avons examiné comparativement le comportement des diverses parties de l'intestin du cobaye et nous avons constaté que le gros intestin est beaucoup moins variable que l'intestin grêle. La plu-

part de nos expériences ont été faites sur la partie du gros intestin, le rectum, et non sur la partie caecale utilisée en 1937 par RIESSER [19].

Technique. — La technique que nous avons employée est dans ses grandes lignes la même que celle de BARSOUM et GADDUM. Son principe est celui de la méthode classique de MAGNUS [17 bis] pour l'enregistrement des mouvements pendulaires de l'intestin. L'appareil que nous avons utilisé comprend en premier lieu un thermostat qui permet de maintenir la température à 38°. Une grande éprouvette de deux litres remplie de Tyrode plonge dans le thermostat et communique par une tubulure inférieure avec une petite cuve de 100 cc. dans laquelle sera immergé le fragment d'intestin; grâce à un siphon qui affleure à la partie supérieure de la cuve, on peut maintenir constant le niveau du liquide; ce dispositif permet le renouvellement de la solution de Tyrode à l'intérieur de la cuve. Enfin un tube capillaire, dont l'extrémité inférieure est recourbée en S et qui plonge dans la cuve, permet d'une part l'arrivée d'air ou d'oxygène en fines bulles, d'autre part la fixation d'une des extrémités du fragment d'intestin, l'autre extrémité étant reliée par un fil au levier inscripteur du myographe; les mouvements de l'organe s'inscrivent sur un cylindre tournant très lentement.

Les fragments d'organes sont prélevés sur l'animal décapité, vidés doucement de leur contenu et immergés immédiatement dans une solution de Tyrode à 38 degrés. Tandis qu'un fragment sert immédiatement et est fixé à l'appareil de suspension, les autres fragments sont transportés à la glacière et serviront pour

des titrages ultérieurs. La solution de Tyrode que nous utilisons se prépare extemporanément à partir des deux solutions suivantes :

SOLUTION 1

ClNa	65 g.
ClK	1 g. 4
Cl ² Ca	1 g. 2
PO ⁴ H ² Na	0 g. 2
OH ²	950 cm ³

SOLUTION 2

CO ³ HNa	30 g.
OH ²	500 cm ³

On prend 95 cc. de la solution 1, 5 cc. de la solution 2 et on ajoute 900 cc. d'eau distillée.

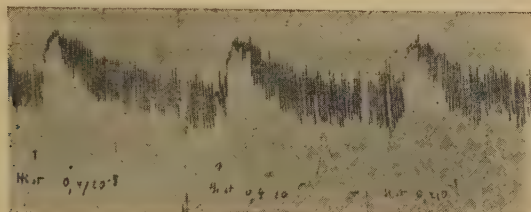
Dès sa fixation au levier inscripteur du myographe, l'intestin réagit spontanément par une lente montée de tonus. Ce n'est que lorsque le tonus s'est stabilisé que le titrage peut être commencé, il faut compter au maximum une demie-heure.

Contrôle de la méthode sensibilité et constance

Sensibilité du rectum à l'histamine. — Si on ajoute aux 100 cc. du bain de Tyrode des quantités progressivement croissantes d'histamine, en ayant soin de laver la préparation entre les différents essais, on constate qu'il suffit de faibles quantités d'histamine pour obtenir une contracture immédiate du fragment d'intestin. Cette contracture ne se maintient pas et au bout de quelques minutes on constate que le tonus a repris sa valeur initiale. En général l'élévation du

tonus s'observe avec des concentrations de $2 \cdot 10^{-9}$. Nous avons cependant pu l'observer dans quelques cas avec la dilution de 10^{-9} et au contraire, il a fallu parfois atteindre une concentration de $5 \cdot 10^{-9}$ pour qu'elle puisse avoir lieu.

Le rectum de cobaye présente donc en général vis-à-vis de l'histamine une grande sensibilité, très suffisante pour permettre le titrage du poison dans les préparations pharmaceutiques. Mais il ne suffit pas que la sensibilité soit grande, il faut aussi d'une part, que les effets provoqués par la même dose plusieurs fois répétée soient constants, d'autre part, que les effets produits par des doses voisines soient différents.



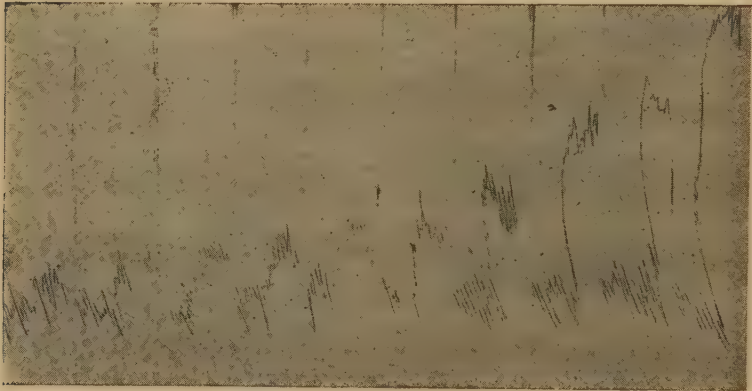
Effets identiques produit par une même concentration d'histamine sur le rectum de cobaye (Expérience du 2/6/43).

1° *Constance des effets produits par une même dose.*

— Si la concentration d'histamine n'est pas trop forte, on constate que la même dose répétée de nombreuses fois produit des effets tout à fait comparables. Seule l'élévation de tonus provoquée par la première introduction d'histamine peut parfois être légèrement moins forte que dans les essais ultérieurs. Le graphique N° V (Exp. du 2/6/43) montre bien la constance des effets produits par l'histamine à la concentration de $4 \cdot 10^{-9}$ après le 2^e, le 3^e et le 5^e essai. Il faut naturellement attendre entre deux applications d'histamine

que l'intestin ait repris son tonus normal, ce qui a lieu au bout de quelques minutes dans la presque totalité des cas. Si la concentration d'histamine devient trop forte ($5 \cdot 10^{-8}$ ou 10^{-7}), le retour au tonus initial peut n'avoir lieu que très lentement; il en résulte souvent une diminution de la sensibilité ultérieure de la préparation.

2° *Effets différents produits par deux doses voisines d'histamine.* — Si on fait agir successivement dans les 100 cc. du bain de Tyrode des doses d'histamine de



H. 10^{-6} dans 100 cc Tyrode.

0,10 0,20 0,30 0,40 0,50 0,60 0,70 0,80 0,90 1 cm³
Effets différents produits par deux doses voisines d'histamine sur le rectum de cobaye (Expérience N° VI du 21/2/44).



H. 10^{-5} dans 100 cc de Tyrode.

0,10 0,15 0,20 0,40 0,60 0,80 1 cm³
Effets différents produits par deux doses voisines d'histamine sur le rectum de cobaye (Expérience N° VII du 25/2/44).

0γ 1, 0γ 2, 0γ 3, 0γ 4, etc... jusqu'à 1γ on constate que l'élévation du tonus produite par chacune de ces doses augmente régulièrement ainsi que le montre le graphique N° VI (Exp. 21/2/44). Il en est de même avec le graphique N° VII (Exp. 25/2/44) qui correspond à un intestin moins sensible à l'histamine : des quantités très voisines de 1γ, 1γ5, 2γ d'histamine produisent des effets différents.

Dosage de l'histamine dans une préparation pharmaceutique

On cherche d'abord à l'aide d'une solution étalon de dichlorhydrate d'histamine au 1/1000 préparée au laboratoire quel est l'ordre de grandeur de la quantité de substance qui doit être ajoutée au bain pour produire un effet net. On dilue alors la solution étalon jusqu'à un titre tel qu'il suffise d'introduire 1/10 cc. dans le bain pour produire une élévation de tonus de 2 à 3 cm. de hauteur. On prépare ensuite une solution de même titre provenant de la préparation pharmaceutique et on inscrit la contraction correspondant à l'introduction de 1/10 de cc. de cette solution. Si la dose d'histamine indiquée par la formule est exacte, on doit observer la même élévation de tonus dans les deux cas; s'il en est ainsi, on fait un troisième essai avec la solution étalon pour s'assurer que la sensibilité du fragment d'intestin n'a pas changé au cours de l'expérience. Si, au contraire, la solution d'histamine provenant de la préparation donne une montée de tonus différente de celle obtenue avec la solution étalon, on fait alors varier la proportion de cette der-

nière dans le bain jusqu'à ce qu'on obtienne un effet identique. Si l'on doit faire plusieurs essais successifs, on s'assurera de temps en temps que la sensibilité de l'intestin n'a pas varié.

Nous avons contrôlé plusieurs préparations pharmaceutiques à base d'histamine en utilisant cette méthode et nous avons, dans tous les cas, obtenu des résultats très satisfaisants.

Tous les auteurs qui ont dosé l'histamine en utilisant l'intestin grêle de cobaye ont atropinisé la préparation pour les deux raisons suivantes : d'une part l'atropine empêche la montée de tonus due à l'acétylcholine qui peut être contenue dans les liquides biologiques, d'autre part, enraye les contractions spontanées de l'intestin qui sont gênantes. Dans le cas où nous sommes placés, nous n'avons pas à nous préoccuper de la présence possible d'acétylcholine dans nos solutions; de plus en ce qui concerne les contractions spontanées de la musculature du rectum, celles-ci sont en général très régulières, beaucoup plus régulières que celles de l'intestin grêle qui présentent souvent des variations de tonus extrêmement importantes, et ne gênent pas l'appréciation de la hauteur de la contraction histaminique; on peut donc dans la plupart des cas faire le dosage sur des préparations non atropinisées.

CONCLUSION. — Ainsi il est possible d'utiliser le rectum de cobaye pour le dosage de l'histamine dans les préparations pharmaceutiques. Sa sensibilité est un peu moins grande que celle de l'intestin grêle, puisqu'elle permet de déceler des concentrations d'histamine de 2 à 5 10^{-9} tandis que les chiffres donnés pour

l'intestin grêle sont soit de $1,3 \cdot 10^{-9}$ d'après GUGGENHEIM et LOEFFLER [8], soit de 10^{-9} d'après WATANABE [25].

Elle est cependant amplement suffisante pour permettre le contrôle des préparations pharmaceutiques d'histamine et donne des résultats bien supérieurs aux méthodes chimiques de dosage. De plus, le grand avantage que nous trouvons dans l'emploi de cette portion d'intestin est que tous les fragments prélevés sur les différents animaux ont présenté une sensibilité à peu près égale; aucun animal ne s'est montré absolument impropre au dosage comme c'est trop souvent le cas avec l'intestin grêle. Etant donné que les fragments d'un même intestin peuvent être utilisés plusieurs jours de suite, il en résulte une appréciable économie d'animaux.

CONCLUSIONS

Le présent travail est consacré à l'étude des méthodes chimiques et biologiques de titrage de l'histamine dans les préparations pharmaceutiques et dans les milieux biologiques.

§ I. — Dosage chimique

Ce dosage s'effectue par colorimétrie en appréciant, comparativement à une solution étalon, l'intensité de la teinte rouge que donne l'histamine dans sa diazotation par l'acide sulfanilique. Deux cas ont été considérés, celui des solutions pures et celui des liquides ou milieux biologiques.

1° *Solutions pures.* — La technique que nous avons étudiée est celle de P. THOMAS, dont nous avons déterminé quelques-unes des conditions les plus favorables (choix de l'écran, temps de réaction) et avec laquelle nous avons établi une courbe des intensités des teintes pour les diverses doses. Cette courbe nous a permis de comparer cette méthode avec les modifications apportées par SCHWARTZ et RIEGERT d'une part, et par MACIAG et SCHOENTAL de l'autre. Cette dernière méthode qui comporte l'addition d'alcool nous a paru préférable car elle donne lieu à une coloration plus rapide et plus stable alors que sa sensibilité est aussi grande.

2° *Solutions d'histamine dans les milieux biologiques.* — Parmi les diverses méthodes proposées nous n'avons étudié que celle qui consiste en l'adsorption de l'histamine par la permutite, suivie de l'élution par une solution saline concentrée ou ammoniacale diluée.

Nous en avons fixé les conditions les plus favorables et nous l'avons appliquée à du sérum de cheval additionné d'histamine. Aussi bien dans ce cas, que dans celui d'une solution pure d'histamine, la méthode d'adsorption et d'élution ne permet pas de retrouver par le dosage colorimétrique plus de 70 % de l'histamine introduite.

§ II. — Dosage biologique

Ce dosage s'effectue en examinant la réaction produite sur un organe isolé par la solution d'histamine dont on se propose de déterminer le titre, comparativement à la réaction produite par une solution étalon préparée au laboratoire. Un seul cas a été considéré ici, celui du titrage de l'histamine, dans les préparations pharmaceutiques, c'est-à-dire 1p 1.000 à 1p 10.000.

Les méthodes utilisées portent les unes sur le cœur et sur l'estomac de grenouille, les autres sur l'intestin de cobaye et surtout sur la partie terminale du gros intestin.

1° *Cœur et estomac de grenouille.* — Ces deux organes se sont montrés impropres au dosage de l'histamine; ils ne réagissent en effet que pour de fortes concentrations et les réactions produites sont assez inconstantes.

2° *Intestin de cobaye.* — a) La méthode utilisant le gros intestin de cobaye s'est montrée tout à fait satisfaisante. Pour effectuer le dosage on examine comparativement l'amplitude de la contracture provoquée sur l'intestin par une solution d'histamine provenant

de la préparation examinée et celle que produit une solution étalon de titre connu.

b) Le gros intestin semble préférable à l'intestin grêle pour le dosage de l'histamine dans les préparations pharmaceutiques, sa sensibilité est en effet presque aussi grande et de plus il permet de faire les dosages avec un nombre d'animaux plus réduit.

§ III. — Comparaison des méthodes chimiques et biologiques

Les résultats obtenus avec la méthode de dosage biologique sont nettement supérieurs à ceux que peut donner la méthode chimique.

Vu : le Président de la thèse,
J. RÉGNIER

Vu : Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
Paris, le 6 novembre 1944

A. DAMIENS

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Paris, le 9 novembre 1944

ROUSSY

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARSOUM et GADDUM. — The pharmacological estimation of adenosine and histamine in blood. *Jour. of physiol.* 1935, 85, p. 1.
- [2] BERESIN W., cité par GUGGENHEIM. — Die biogenen Amine. 1928, 2 Aufl. p. 219, Berlin Julius Springer, Russki Wratsch, 1913.
- [3] CODE M. — The quantitative estimation of histamine in the blood. *Jour. of physiol.* 1937, 89, p. 257 (a).
- [4] CODE M. — The source in blood of the histamine like constituent. *Jour. of physiol.* 1937, 90, p. 349 (b).
- [5] EINIS W. — Biochem Ztschft 1913, 52, p. 96. Über die Wirkung des Pituitrins und Histamins auf die Herzaktion.
- [6] FELDBERG W. et SCHILF E. — Histamine, seine Pharmacologie und Bedeutung für die Humoralphysiologie. Berlin Julius Springer 1930, p. 26, p. 176 et p. 346.
- [7] GUGGENHEIM M. — Proteinogene Amine. Biochem. Ztschft 1913, 51, p. 369.
ten und Körperflüssigkeiten. Biochem. Ztschft.
- [8] GUGGENHEIM M. et LOEFFLER W. — Biologischer Nachweis proteinogener Amine in Organ-extrak- 1916, 72, p. 303.
- [9] HANKE M. et KOESSLER K. — Studies of proteinogenous amines. A microchemical colorimetric method for estimating imidazol derivatives. *Jour. of biol. chem.* 1919, 39, p. 496.

- [10] HANKE M. et KOESSLER K. — A method for the quantitative colorimetric estimation of histamine in protein and protein containing matter. *Jour. of biol. chem.* 1920, 43, p. 543 ; 1924, 59, p. 803.
- [11] KRULL, cité par FELDERBG W. et SCHILF E., p. 346.
- [12] LESURE A. — Polypeptides et acides aminés de l'organisme (caractérisation et méthode de dosage). *Jour. de ph. et de ch.* 1^{er} et 16 juillet; 1^{er} et 16 août 1937, 26.
- [13] LESURE A. et THOMAS P. — Contribution à l'étude des monozeptides et de leurs dérivés décarboxylés ou désaminés dans l'organisme humain. Phénomènes possibles d'équilibre ou d'antagonisme. *Bull. doct. en ph.* n^{os} 5 et 6, 1936, p. 157, 177.
- [14] LIO G. — Arch. internat. Pharmacod. 1923, 33, 409.
- [15] LOEPER, LESURE A. et THOMAS P. — Contribution à l'étude des imidazols dans urines, selles et sérums. *Bull. soc. ch. biol.* 1934, p. 1383.
- [16] MAC GREGOR et THORPE.
- [17] MACIAG A. et SCHOENTAL R. — Modification de la réaction de Pauly pour la recherche microcolorimétrique (photométrique) des imidazols (histamine) *Mikrochemie Band* 1938, 24, 3 Heft p. 243.
- [17^{bis}] MAGNUS R. — Pflügers Arch. 1904, 102, p. 123.
- [18] MARTIN. — Chem. zentr. 1943, 1, 861.
- [19] RIESSER O. — Histaminstudien. *Arch. exper. Path. u. Pharm.* 1937, 187, 1.
- [20] SCHWARTZ A. et RIEGERT A. — Un procédé simple d'isolement quantitatif de l'histamine et de la tyramine dans le sérum et le plasma sanguin. *C. R. Soc. biol.* 1936, 123, 3, p. 219.

- [21] SCHWARTZ A. et RIEGERT A. — Le dosage des traces d'histamine dans le sang par le procédé de la permutite, simplification de la technique primitive. *C. R. Soc. biol.* 1936, 123, 3, p. 801.
 - [22] THOMAS P. — Réaction de l'histamine et de l'histidine. *Ch. biol.* 2, p. 176.
 - [23] TIFFENEAU R. — Action inotrope négative de l'histamine. Effet secondaire inotrope positif dû à la formation d'une substance antagoniste. *C. R. Soc. biol.* 1941, 135, p. 1031.
 - [24] UNGAR, PARROT J.-L., POCCOULE. — Sur la présence de l'histamine dans le sang humain normal. *C. R. Soc. biol.* 1937, 124, p. 1202.
— Sur les voies d'élimination de l'histamine et son absence dans les urines normales. *C. R. Soc. biol.* 1937, 124, p. 1204.
 - [25] WATANABE K. Cité par FELDBERG W. et SHILF E., p. 26.
 - [26] Id., p. 176.
 - [27] WHITEHORN John C. — Permutit as a reagent for amines. *Jour. of biol. Chem.* 1923, 56, p. 751.
-

